

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 31 日 (31.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08416 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/00
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06371
(22) 国際出願日: 2001 年 7 月 24 日 (24.07.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2000-222743 2000 年 7 月 24 日 (24.07.2000) JP
特願2000-254407 2000 年 8 月 24 日 (24.08.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤誠志 (KATO, Seishi) [JP/JP]; 〒229-0014 神奈川県相模原市若松3丁目46番50号 Kanagawa (JP). 長田直樹 (NAGATA, Naoki) [JP/JP]; 〒229-0012 神奈川県相模原市西大沼3丁目3

番41号 トラッドハウスK102号室 Kanagawa (JP). 藤村尚子 (FUJIMURA, Naoko) [JP/JP]; 〒229-0026 神奈川県相模原市陽光台5丁目3番6号 Kanagawa (JP). 小林みどり (KOBAYASHI, Midori) [JP/JP]; 〒242-0006 神奈川県大和市南林間3丁目2番3号306 Kanagawa (JP). 伊藤巧一 (ITO, Koichi) [JP/JP]; 〒229-0037 神奈川県相模原市千代田6丁目9番25号 Kanagawa (JP). 石塚芳子 (ISHIZUKA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒228-0803 神奈川県相模原市相模大野2丁目11番16号 111 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PREPARING ANTIBODY BY GENE IMMUNIZATION

(54) 発明の名称: 遺伝子免疫による抗体作製法

(57) Abstract: A method of preparing an antibody characterized by inoculating an animal with an expression vector capable of expressing a fused protein having an antigen protein fused in the C terminal side of a transmembrane domain the N terminal side of which is located in a cell while the C terminal side of which is located outside the cell, and isolating and purifying an antibody against this antigen protein from the animal. According to the method, an antibody against an antigen protein which can be hardly obtained by the conventional gene immunization methods can be prepared. The antibody thus obtained is useful in drugs, diagnostics and laboratory reagents.

(57) 要約:

この出願の発明は、N 末端側が細胞内に、C 末端側が細胞外に位置する膜貫通ドメインの C 末端側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する発現ベクターを動物に接種し、この動物から抗原蛋白質に対する抗体を単離・精製することの特徴とする抗体作製法を提供する。この発明により、従来の遺伝子免疫法では困難であった抗原蛋白質に対する抗体を作製することができる。得られた抗体は、医薬・診断薬・研究用試薬として有用である。

WO 02/08416 A1

明細書

遺伝子免疫による抗体作製法

5

技術分野

この出願の発明は、遺伝子免疫による抗体作製法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、医薬・診断薬・研究用試薬等として有用な抗体を
10 容易に作製することができる方法と、この方法に使用する発現ベクターに関するものである。

背景技術

15

抗体は、特定の蛋白質を認識して結合する性質を有するため、蛋白質の検出、精製、除去、活性阻害等の目的で、研究試薬として広く利用されている。最近では、研究用試薬としてのみならず、医薬・診断薬としての用途も広がっている。

従来、抗体を作製するには、抗原となる蛋白質を大量に精製した後、ウサギや
20 マウスなどの動物に注射し、血清中に産生される抗体を得るという方法が取られてきた。しかし、精製抗原蛋白質を大量に得るには、多くの時間と労力を要した。そこで、より簡便な抗体作製法が望まれている。

最近、インフルエンザウイルス核蛋白質をコードする遺伝子を発現ベクターに
25 組み込んで、これを DNA のままマウスの筋肉に注射すると、マウス体内でウイルス蛋白質が生産され、しかも血清中にこの蛋白質に対する抗体が産生されることが報告された (Ulmer et al., Science 259: 1745-1749, 1993; Ginsbert et al., "Vaccines 93")。その結果、マウスがウイルスに対する免疫能を獲得することから、この発現ベクターは新型のワクチン、すなわち DNA ワクチンとして注目

を集めている。このように、抗原蛋白質の発現ベクターを直接動物に接種して、免疫能を付与することを遺伝子免疫と呼んでいる。ただし、遺伝子免疫を用いた場合、抗原の種類によっては、産生される抗体の力価が非常に小さかったり、抗体が得られない場合もある。

5

遺伝子免疫の効率に及ぼす抗原蛋白質の発現部位の影響を調べるために、オボアルブミンをトランスフェリンレセプターの膜貫通ドメインの下流に融合して膜型にしたものを、マウスの筋肉あるいは皮下に注射して遺伝子免疫を行った例が報告されているが、膜型にすることによって、抗体の力価はむしろ減少している

10 (Boyle et al., Int. Immunol. 9: 1897-1906,1997)。

この出願の発明は、従来の遺伝子免疫法では作製困難な蛋白質に対する抗体を作製する方法を提供することを課題としている。

15 また、この出願の発明は、前記の抗体作製法に使用する発現ベクターを提供することを課題としている。

発明の開示

20

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、N 末端側が細胞内に、C 末端側が細胞外に位置する膜貫通ドメインの C 末端側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する発現ベクターを動物に接種し、この動物から抗原蛋白質に対する抗体を単離・精製することを特徴とする抗体作製法を提供する。

25

—この抗体作製法においては、膜貫通ドメインが、配列番号 2 の少なくとも位置 1-26 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを好ましい態様としている。

また、この出願は、N末端側が細胞内に、C末端側が細胞外に位置する膜貫通ドメインの C 末端側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する発現ベクターを提供する。

- 5 この発現ベクターにおいては、膜貫通ドメインが、配列番号 2 の少なくとも位置 1-26 のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを好ましい態様としている。

10

図面の簡単な説明

図 1 は、ウロキナーゼ融合遺伝子の構造を示した図である。

- 15 図 2 は、ウロキナーゼ発現ベクターで遺伝子免疫を行った場合の ELISA による抗体価測定例を示す図である。

図 3 は、核蛋白質 HP10496 発現ベクターで遺伝子免疫を行った場合の ELISA による抗体価測定例を示す図である。

- 20 図 4 は、各種膜蛋白質の膜貫通ドメインとウロキナーゼとの融合蛋白質のそれぞれの N 末端のアミノ酸配列を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

25

この発明の抗体作製法において、動物に接種する発現ベクターは、抗原蛋白質をコードするポリヌクレオチドと、膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを保有する発現ベクターとして構築する。

抗原蛋白質は、生体内で抗原抗体反応を生じさせる蛋白質であればどのような

ものであってもよい。抗原蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、オープンリーディングフレーム（ORF）を有しているものであれば、ゲノム DNA、cDNA、合成 DNA などいかなるポリヌクレオチドでもよい。抗原蛋白質が本来分泌蛋白質である場合には、これらの蛋白質由来のシグナル配列ペプチドを除去したものを
5 を用いる。

膜貫通ドメインとしては、N 末端側が細胞内にあり、C 末端側が細胞外にくるものであれば、いかなるものでもよい。例えば、II 型膜蛋白質の膜貫通ドメインや、マルチスパン型膜蛋白質の膜貫通ドメインを用いることができる。これらの
10 膜貫通ドメインの C 末端側に抗原蛋白質を融合させた蛋白質は、抗原蛋白質部分が細胞膜表面に存在する形になる。膜貫通ドメインとして、例えば、ヒト II 型膜蛋白質 HP10085（配列番号 2）の膜貫通ドメインを用いることができる。この場合、抗原蛋白質と融合させる膜貫通ドメインは、配列番号 2 の少なくとも位置 1 のメチオニン（Met）から位置 26 のリジン（Lys）までのポリペプチド
15 であり、これをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1（ヒト II 型膜蛋白質 HP10085 cDNA）の少なくとも位置 151-228 の塩基配列を有している。このポリヌクレオチドと、前記の抗原蛋白質をコードするポリヌクレオチドとを連結し、膜貫通ドメイン（ポリペプチド）の C 末端側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する融合ポリヌクレオチドを用いて発現ベクターを構築することができ
20 る。

融合蛋白質発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターであればいかなるものでもよく、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター
25 などが例示できる。これらのベクターに、前記 2 種類のポリヌクレオチドをクローン化し、それぞれがコードする蛋白質を融合蛋白質として発現する発現ベクターを作製する。

発現ベクターを接種する動物としては、マウス、ラット、ウサギなどの哺乳類

動物、ニワトリなどの鳥類など、一般に抗体作製に使用される動物が用いられる。動物への発現ベクターの接種は、遺伝子銃などを用いて行うのが好ましい。遺伝子銃を用いる場合は、発現ベクターを金粒子などに吸着させたものを、ガス圧などにより皮膚に噴射することによって接種する。発現ベクターの接種量は動物によって異なるが、一匹当たり $0.1 \mu\text{g} - 1 \text{ mg}$ の範囲内が好ましい。接種は一回でもよいが、抗体生産を確実にするために一定間隔を置いて 2 回以上行なうことが望ましい。

抗体産生の有無は、血液を採取後、血清を分離し、抗原蛋白質との結合反応を調べることによって行なう。例えば、酵素免疫アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロットティング、免疫沈降、抗体染色など公知の方法を用いることができる。これらの方法で血清中に抗体が存在することを確認したのち、血清をそのままポリクロナル抗体試料として用いることもできるし、アフィニティカラムクロマトグラフィーなどにより IgG を精製して用いることもできる。また免疫能を獲得した動物から脾臓を摘出し、常法によりモノクローナル抗体を作製することもできる。

実施例

20

次に実施例を示して、この出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、DNA の組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献 ("Molecular Cloning. A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

25

(1) ウロキナーゼ融合蛋白質発現ベクターの構築

抗原蛋白質としてウロキナーゼを用いる場合、分泌発現用、膜型発現用、細胞

内発現用の 3 種類の発現ベクターを用いた。すなわち、分泌発現用としては、ウロキナーゼのシグナル配列とウロキナーゼのプロテアーゼドメインを発現する pSSD1-UPA22 (Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 163: 193-196, 1995)、膜型発現用として、II 型膜蛋白質 HP10085 (配列番号 2) の N 末端から第 35 番目の
5 プロリン (Pro) までとウロキナーゼのプロテアーゼドメインを融合させた蛋白質を発現できる pSSD3-10085H (Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 228:161-167, 1999)、細胞内発現用として、ウロキナーゼのシグナル配列を除去し、ウロキナーゼのプロテアーゼドメインのみを発現する pSSD1-UPA2 (Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 163: 193-196, 1995) をそれぞれ用いた。それぞれの融合遺伝子部分の構造を図 1 に示した。いずれも融合蛋白質をコードする部分以外
10 には同じ構造を有している。すなわち、SV40 の初期プロモーター、SV40 の 16S mRNA スプライシング領域、および SV40 のポリ(A)付加部位を有している。

(2) 核蛋白質融合蛋白質発現ベクターの構築

15 抗原蛋白質として、核内のスプライセオソームに局在する蛋白質 HP10496 を用いた。この蛋白質をコードしている cDNA クローン pHP10496 は、ヒト胃癌 cDNA ライブラリー (WO98/21328) からクローン化されたもので、配列番号 3 の塩基配列ならびに ORF を有しており、ORF は配列番号 4 のアミノ酸配列からなる蛋白質 HP10496 をコードしている。*EcoRV* 認識部位を付加した翻訳開始コ
20 ドンから始まる 30 mer のセンスプライマー (配列番号 5 のオリゴヌクレオチド) と、*EcoRV* 認識部位を付加した停止コドンまでを含む 30 mer のアンチセンスプライマー (配列番号 6 のオリゴヌクレオチド) を用い、pHP10496 を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅した。PCR 産物を *EcoRV* で消化し、膜型ウロキナーゼ発現ベクター pSSD3-10085H の *EcoRV*-*NotI* (平滑末端化) 部位に挿入
25 し、融合遺伝子発現ベクター pHP10085N-10496 を構築した。

抗体検出用の抗原蛋白質を得るため、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質を大腸菌で発現させるための発現ベクターを構築した。*EcoRI* 認識部位を付加した翻訳開始コドンから始まる 28 mer のセンスプライマー (配列番号 7 のオリゴヌクレオチド) と、*Sall* 認識部位を付加した停止コド

ンまでを含む 32 mer のアンチセンスプライマー（配列番号 8 のオリゴヌクレオチド）を用い、pHP10496 を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅した。PCR 産物を *EcoRI* と *SalI* で消化し、pGEX-5X-1（Pharmacia 社製）の *EcoRI*-*SalI* 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、宿主大腸菌 BL21 の形質転換を行った。

- 5 LB 培地中で 37°C で 5 時間培養し、IPTG を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、さらに 37°C で 2.5 時間培養した。菌体を遠心により分離し、溶解溶液（50 mM Tris-HCl（pH7.5）, 1mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF）に溶かし、一度 -80°C で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。
- 1000 x g で 30 分遠心し、上清にグルタチオンセファロース 4B を加え、4°C で 1
- 10 時間インキュベートした。ビーズを十分洗浄した後、溶出溶液（10 mM Tris-HCl, 50 mM グルタチオン）で融合蛋白質を溶出した。その結果、分子量約 47 kDa の GST-HP10496 融合蛋白質を得た。

(3) 遺伝子免疫

- 15 遺伝子免疫は、遺伝子銃（Helios Gene Gun System：日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社）を用いて行った。プロトコールに従って発現ベクタープラスミド DNA を金粒子に付着させた。プラスミド DNA 2 μ g に相当する DNA 被覆金粒子を遺伝子銃を用いて、一検体当たり 3 匹のマウス（BALB/c）の鼠径部の皮膚に射入した。週 2 回、4 週間免疫を行った後、血液を採取した。

20

(4) ELISA による抗体の検出

- 抗原蛋白質として、市販のウロキナーゼ（和科盛純薬）と大腸菌で発現させた GST-HP10496 をコートしたプレートを用いて、ELISA を行った。ウロキナーゼ、核蛋白質 HP10496 を抗原として遺伝子免疫した血清を用いて抗体の力価を測定
- 25 した結果を、それぞれ図 2 と図 3 に示す。いずれの場合にも、HP10085 の N 末端を融合させた蛋白質発現ベクターで免疫した場合のみ抗体の産生が認められた。

- (5) 種々の II 型膜蛋白質の膜貫通ドメインとウロキナーゼの融合蛋白質を用いた遺伝子免疫

ヒト完全長 cDNA バンクの中から、次の 5 種類の II 型膜蛋白質 cDNA、HP01347（配列番号 9）、HP10328（配列番号 10）、HP10390（配列番号 11）、HP10433（配列番号 12）、HP10481（配列番号 13）を同定し、それぞれの膜貫通ドメインとウロキナーゼの融合蛋白質を発現するベクターを構築した

5 （Yokoyama-Kobayashi et al., Gene 228:161-167, 1999）。それぞれの N 末端のアミノ酸配列を図 4 に示す。

これらの発現ベクターを用いて、(3)に記載の方法で遺伝子免疫を行い、(4)に記載の方法でウロキナーゼに対する抗体の検出を行ったところ、いずれの場合にも、HP10085 の場合と同様の抗体産生が認められた。

10

産業上の利用可能性

この発明により、従来の遺伝子免疫法では困難であった抗原蛋白質に対する抗

15 体を作製することができる。得られた抗体は、医薬・診断薬・研究用試薬として有用である。

請求の範囲

1. N 末端側が細胞内に、C 末端側が細胞外に位置する膜貫通ドメインの C 末端
側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する発現ベクターを動物に接種し、
5 この動物から抗原蛋白質に対する抗体を単離・精製することを特徴とする抗体作
製法。
2. 膜貫通ドメインが、配列番号 2 の少なくとも位置 1-26 のアミノ酸配列を
有するポリペプチドである請求項 1 の抗体作製法。
- 10 3. N 末端側が細胞内に、C 末端側が細胞外に位置する膜貫通ドメインの C 末
端側に抗原蛋白質が融合した融合蛋白質を発現する発現ベクター。
4. 膜貫通ドメインが、配列番号 2 の少なくとも位置 1-26 のアミノ酸配列を
15 有するポリペプチドである請求項 3 の発現ベクター。

図 1

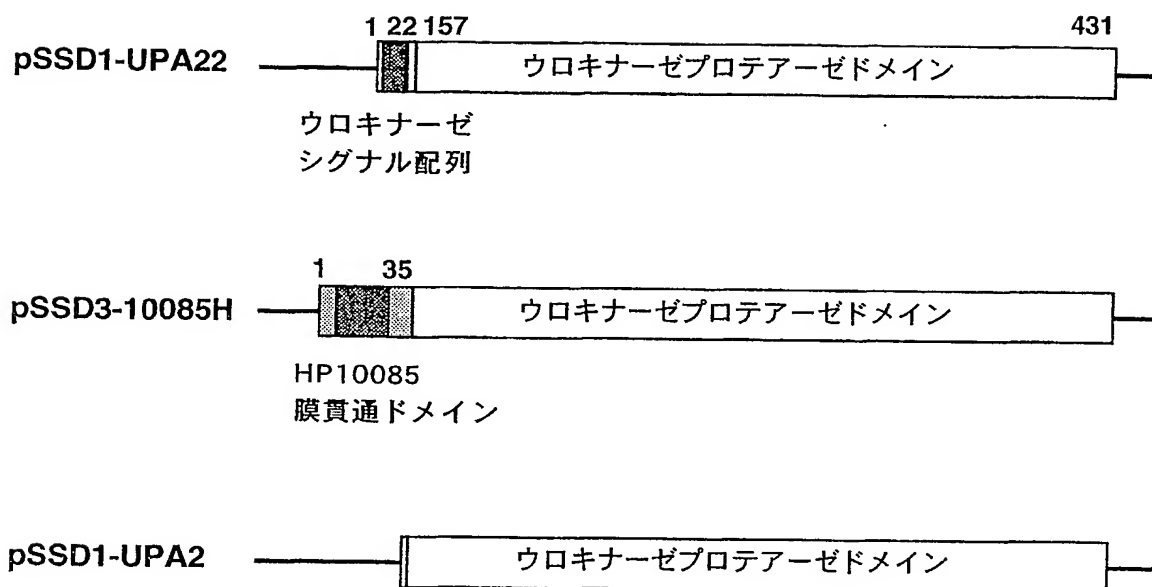


図 2

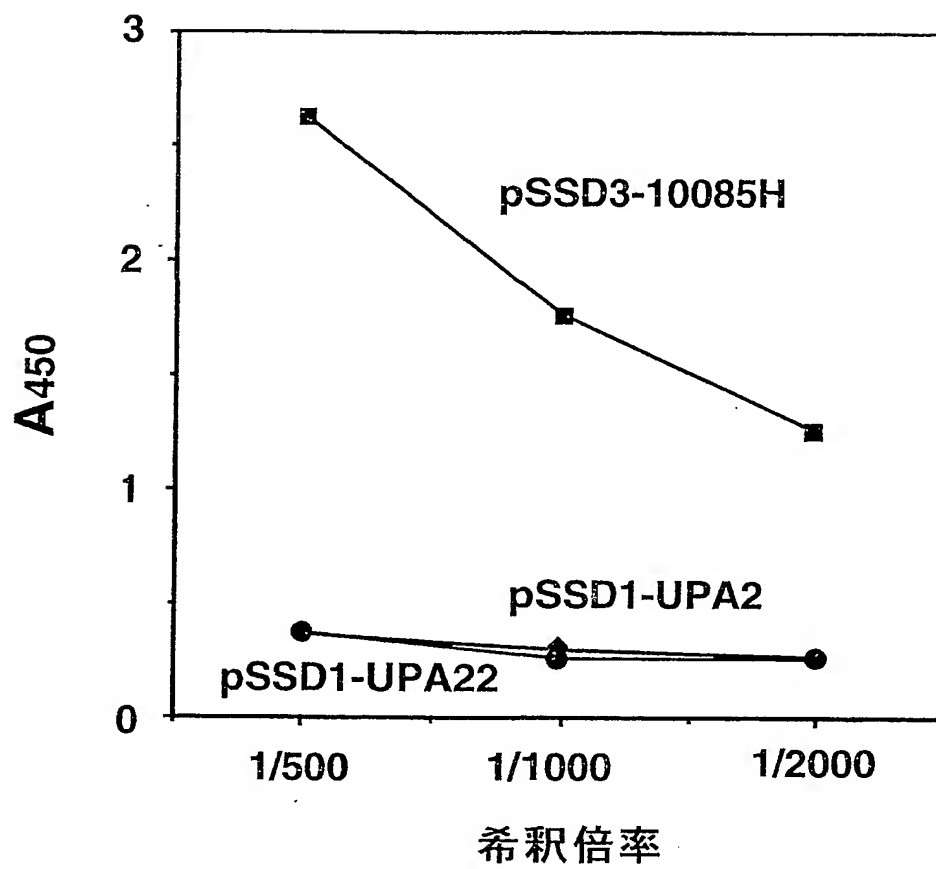
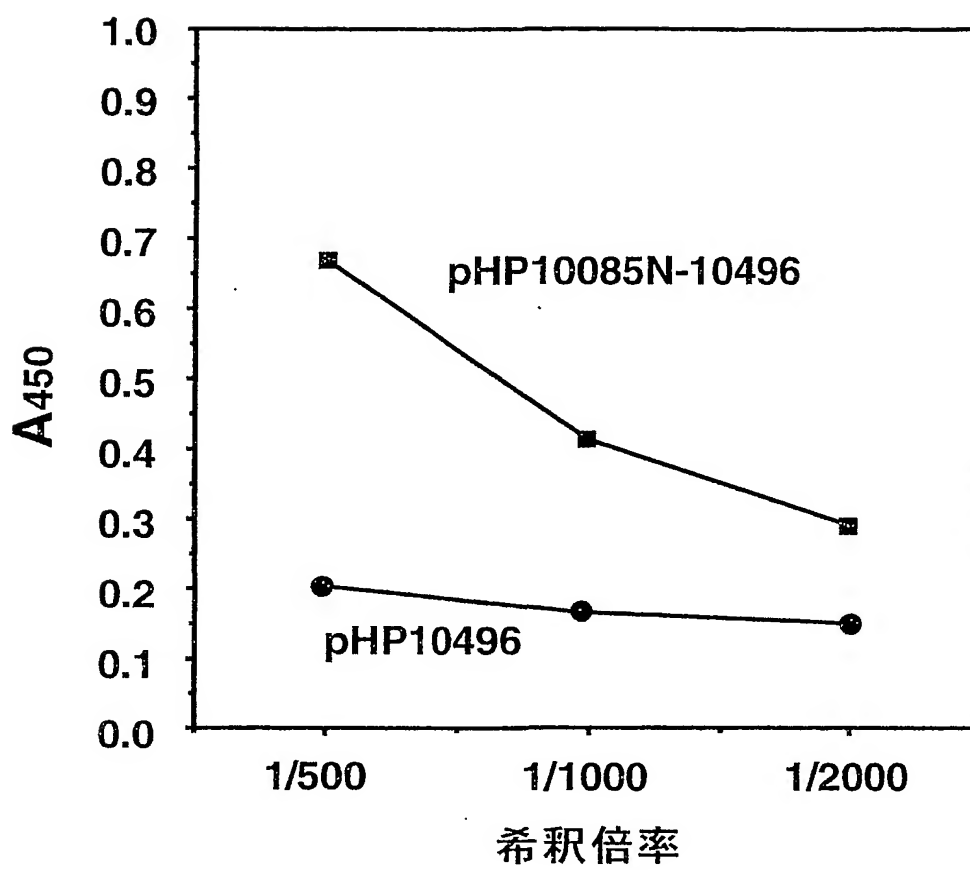


図 3





4

1 10 20 30 40 50 60 70
 HP01347 MSDSKEPRVQQLGLGCLGHGALVLOLLSFMLLAGVIVAILVOVSKVPSSLSQEQSEQDAIYQNLTLQKAAV-uPA

1 10 20 30 40 50 60 70 80
 HP10328 MKYLRHRRPNATLIIAIGAF~~TLLLSLVSPPTCKVQEQPPA~~PEALAWPTPTRPAPAPACHANTSMVTHPDEFATQPHV

90 100 110 120
 QNFLLYRHCRHFLLQDVPPPSKCAQPVFLLLVIKSSPSNYVRRELLRR-uPA

1 10 20 30 40 50
 HP10390 MKGWGWLALLGALLGTAWARRSQDLHCGACRALVDELEWEIAQVDPKKT-uPA

1 10 20 30 40 50 60 70 80
 HP10433 MRRLLIPLALWLGA~~VGVGVAELTEAQRRLQV~~ALEE~~FFHKHPVQWAFQETS~~VESA~~VDTPFP~~PAGIFVRL~~EFLQQT~~SCRKR

90 100 110 120 130
 DWKKPECKVRPNGRKRKCLACIKLGSEDKVLGRLVHCPIETQVLREAE~~EHQETQC-uPA~~

1 10 20 30 40 50 60 70 80
 HP10481 MRLTRKRLCSFLIALYCLFSLYAA~~YHVFGRRRQAPAGSPRGLRKGAA~~PARERRRGRE~~QSTLESE~~WN~~PWEG~~DEKNEQQHR

90 100 110 120 130 140
 FKTSIQILDKSTKGKTDLSVQINGKAAIGLYLWEHIFEGLLDPDSVTAQWREGKSIVGRTOYSFITGP-uPA

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Method for Producing an Antibody with Genetic Immunization

<130> 01F033PCT

<150> JP2000-222743

<151> 2000-07-24

<150> JP2000-254407

<151> 2000-08-24

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 697

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (151).. (600)

<400> 1

tatacctcta gtttggagct,gtgctgtaaa aacaagagta acatttttat attaaagtta 60

aataaagtta caactttgaa gagagtttct gcaagacatg acacaaagct gctagcagaa 120

aatcaaaacg ctgattaaaa gaagcacggt atg atg acc aaa cat aaa aag tgt 174

Met Met Thr Lys His Lys Lys Cys

1

5

ttt ata att gtt ggt gtt tta ata aca act aat att att act ctg ata 222

Phe Ile Ile Val Gly Val Leu Ile Thr Thr Asn Ile Ile Thr Leu Ile

10

15

20

gtt aaa cta act cga gat tct cag agt tta tgc ccc tat gat tgg att 270

Val Lys Leu Thr Arg Asp Ser Gln Ser Leu Cys Pro Tyr Asp Trp Ile

25

30

35

40

ggt ttc caa aac aaa tgc tat tat ttc tct aaa gaa gaa gga gat tgg 318

Gly Phe Gln Asn Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Lys Glu Glu Gly Asp Trp

45

50

55

aat tca agt aaa tac aac tgt tcc act caa cat gcc gac cta act ata 366

Asn Ser Ser Lys Tyr Asn Cys Ser Thr Gln His Ala Asp Leu Thr Ile

60

65

70

att gac aac ata gaa gaa atg aat ttt ctt agg cgg tat aaa tgc agt 414

Ile Asp Asn Ile Glu Glu Met Asn Phe Leu Arg Arg Tyr Lys Cys Ser

75

80

85

tct gat cac tgg att gga ctg aag atg gca aaa aat cga aca gga caa 462
Ser Asp His Trp Ile Gly Leu Lys Met Ala Lys Asn Arg Thr Gly Gln

90

95

100

tgg gta gat gga gct aca ttt acc aaa tcg ttt ggc atg aga ggg agt 510
Trp Val Asp Gly Ala Thr Phe Thr Lys Ser Phe Gly Met Arg Gly Ser

105

110

115

120

gaa gga tgt gcc tac ctc agc gat gat ggt gca gca aca gct aga tgt 558
Glu Gly Cys Ala Tyr Leu Ser Asp Asp Gly Ala Ala Thr Ala Arg Cys

125

130

135

tac acc gaa aga aaa tgg att tgc agg aaa aga ata cac taa 600
Tyr Thr Glu Arg Lys Trp Ile Cys Arg Lys Arg Ile His

140

145

150

gttaatgtct aagataatgg ggaaaataga aaataacatt attaagtgtg aaaccagcaa 660

agtacttttt taattaaaca aagttcgagt ttigtac 697

<210> 2

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Met Thr Lys His Lys Lys Cys Phe Ile Ile Val Gly Val Leu Ile



1 5 10 15
Thr Thr Asn Ile Ile Thr Leu Ile Val Lys Leu Thr Arg Asp Ser Gln
 20 25 30
Ser Leu Cys Pro Tyr Asp Trp Ile Gly Phe Gln Asn Lys Cys Tyr Tyr
 35 40 45
Phe Ser Lys Glu Glu Gly Asp Trp Asn Ser Ser Lys Tyr Asn Cys Ser
 50 55 60
Thr Gln His Ala Asp Leu Thr Ile Ile Asp Asn Ile Glu Glu Met Asn
65 70 75 80
Phe Leu Arg Arg Tyr Lys Cys Ser Ser Asp His Trp Ile Gly Leu Lys
 85 90 95
Met Ala Lys Asn Arg Thr Gly Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Phe Thr
 100 105 110
Lys Ser Phe Gly Met Arg Gly Ser Glu Gly Cys Ala Tyr Leu Ser Asp
 115 120 125
Asp Gly Ala Ala Thr Ala Arg Cys Tyr Thr Glu Arg Lys Trp Ile Cys
 130 135 140
Arg Lys Arg Ile His
145

<210> 3

<211> 548

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>



<221> CDS

<222> (30).. (503)

<400> 3

cttattgctg gcggcctgag gagcccatc atg gcg acg ccc cct aag cgg cgg 53

Met Ala Thr Pro Pro Lys Arg Arg

1

5

gcg gtg gag gcc acg ggg gag aaa gtg ctg cgc tac gag acc ttc atc 101

Ala Val Glu Ala Thr Gly Glu Lys Val Leu Arg Tyr Glu Thr Phe Ile

10

15

20

agt gac gtg ctg cag cgg gac ttg cga aag gtg ctg gac cat cga gac 149

Ser Asp Val Leu Gln Arg Asp Leu Arg Lys Val Leu Asp His Arg Asp

25

30

35

40

aag gta tat gag cag ctg gcc aaa tac ctt caa ctg aga aat gtc att 197

Lys Val Tyr Glu Gln Leu Ala Lys Tyr Leu Gln Leu Arg Asn Val Ile

45

50

55

gag cga ctc cag gaa gct aag cac tcg gag tta tat atg cag gtg gat 245

Glu Arg Leu Gln Glu Ala Lys His Ser Glu Leu Tyr Met Gln Val Asp

60

65

70

ttg ggc tgt aac ttc ttc gtt gac aca gtg gtc cca gat act tca cgc 293

Leu Gly Cys Asn Phe Phe Val Asp Thr Val Val Pro Asp Thr Ser Arg

75

80

85

atc tat gtg gcc ctg gga tat ggt ttt ttc ctg gag ttg aca ctg gca 341

Ile Tyr Val Ala Leu Gly Tyr Gly Phe Phe Leu Glu Leu Thr Leu Ala

90

95

100

gaa gct ctc aag ttc att gat cgt aag agc tct ctc ctc aca gag ctc 389

Glu Ala Leu Lys Phe Ile Asp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Thr Glu Leu

105

110

115

120

agc aac agc ctc acc aag gac tcc atg aat atc aaa gcc cat atc cac 437

Ser Asn Ser Leu Thr Lys Asp Ser Met Asn Ile Lys Ala His Ile His

125

130

135

atg ttg cta gag ggg ctt aga gaa cta caa ggc ctg cag aat ttc cca 485

Met Leu Leu Glu Gly Leu Arg Glu Leu Gln Gly Leu Gln Asn Phe Pro

140

145

150

gag aag cct cac cat tga cttcttcccc ccattctcag acattaaaga 533

Glu Lys Pro His His

155

gcctgaatgc ctttg

548

<210> 4

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 4

Met Ala Thr Pro Pro Lys Arg Arg Ala Val Glu Ala Thr Gly Glu Lys
1 5 10 15
Val Leu Arg Tyr Glu Thr Phe Ile Ser Asp Val Leu Gln Arg Asp Leu
20 25 30
Arg Lys Val Leu Asp His Arg Asp Lys Val Tyr Glu Gln Leu Ala Lys
35 40 45
Tyr Leu Gln Leu Arg Asn Val Ile Glu Arg Leu Gln Glu Ala Lys His
50 55 60
Ser Glu Leu Tyr Met Gln Val Asp Leu Gly Cys Asn Phe Phe Val Asp
65 70 75 80
Thr Val Val Pro Asp Thr Ser Arg Ile Tyr Val Ala Leu Gly Tyr Gly
85 90 95
Phe Phe Leu Glu Leu Thr Leu Ala Glu Ala Leu Lys Phe Ile Asp Arg
100 105 110
Lys Ser Ser Leu Leu Thr Glu Leu Ser Asn Ser Leu Thr Lys Asp Ser
115 120 125
Met Asn Ile Lys Ala His Ile His Met Leu Leu Glu Gly Leu Arg Glu
130 135 140
Leu Gln Gly Leu Gln Asn Phe Pro Glu Lys Pro His His
145 150 155

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 5

cccgatatct catggcgacg ccccctaagc

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 6

cccgatatct caatggtgag gcttctctgg

30

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 7



cccgaattca tggcgacgcc ccctaagc

28

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 8

cccgtcgacg catggtgagg cttctctgga aa

32

<210> 9

<211> 1643

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (25).. (915)

<400> 9

aacatctggg gacagcggga aaac atg agt gac tcc aag gaa cca agg gtg 51

Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Val

1

5



cag cag ctg ggc ctc ctg ggg tgt ctt ggc cat ggc gcc ctg gtg ctg 99

Gln Gln Leu Gly Leu Leu Gly Cys Leu Gly His Gly Ala Leu Val Leu

10

15

20

25

caa ctc ctc tcc ttc atg ctc ttg gct ggg gtc ctg gtg gcc atc ctt 147

Gln Leu Leu Ser Phe Met Leu Leu Ala Gly Val Leu Val Ala Ile Leu

30

35

40

gtc caa gtg tcc aag gtc ccc agc tcc cta agt cag gaa caa tcc gag 195

Val Gln Val Ser Lys Val Pro Ser Ser Leu Ser Gln Glu Gln Ser Glu

45

50

55

caa gac gca atc tac cag aac ctg acc cag ctt aaa gct gca gtg ggt 243

Gln Asp Ala Ile Tyr Gln Asn Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly

60

65

70

gag ctc tca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc 291

Glu Leu Ser Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr

75

80

85

cag ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag 339

Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln

90

95

100

105

gag atc tac cag gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg 387

Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu

110

115

120

cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cgg ctg 435
Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu

125

130

135

aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc 483
Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile

140

145

150

tac cag gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag 531
Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu

155

160

165

aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acg gag ctg aag gct 579
Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Glu Leu Lys Ala

170

175

180

185

gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag 627
Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln

190

195

200

gag ctg acc cag ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gac cag tcc 675
Glu Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Asp Gln Ser

205

210

215

aag cag cag caa atc tat caa gaa ctg acc gat ttg aag act gca ttt 723
Lys Gln Gln Gln Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Asp Leu Lys Thr Ala Phe

220

225

230

gaa cgc ctg tgc cgc cac tgt ccc aag gac tgg aca ttc ttc caa gga 771

Glu Arg Leu Cys Arg His Cys Pro Lys Asp Trp Thr Phe Phe Gln Gly

235

240

245

aac tgt tac ttc atg tct aac tcc cag cgg aac tgg cac gac tcc gtc 819

Asn Cys Tyr Phe Met Ser Asn Ser Gln Arg Asn Trp His Asp Ser Val

250

255

260

265

acc gcc tgc cag gaa gtg agg gcc cag ctc gtc gta atc aaa act gct 867

Thr Ala Cys Gln Glu Val Arg Ala Gln Leu Val Val Ile Lys Thr Ala

270

275

280

gag gag cag ctt cca gcg gta ctg gaa cag tgg aga acc caa caa tag 915

Glu Glu Gln Leu Pro Ala Val Leu Glu Gln Trp Arg Thr Gln Gln

285

290

295

cgggaatgaa gactgtgcgg aatttagtgg cagtggctgg aacgacaatc gatgtgacgt 975

tgacaattac tggatctgca aaaagcccg cgcctgcttc agagacgaat agttgtttcc 1035

ctgctagcct cagcctccat tgttggtatag cagaacttca cccacttgta agccagcgct 1095

tcttctctcc atccctggac cttcacaaat gccctgagac gggttctctgt tcgatttttc 1155

atcccciatg aacctgggtc ttattctgtc ctctgatgc ctccaagttt ccctgggtga 1215

gagcttgtgt tcttggccca tccctggagc tttataagt acctgagtgg gatgcattta 1275

gggggcgggc ttggtatggt' gtagaatcc actctctggt ccttttggag attagactat 1335
ttggattcat gtgtagctgc cctgtcccct ggggcctttat ctcatccatg caaactacca 1395
tctgctcaac ttccagctac acccgtgca cccctttgac tggggacttg ctggttgaag 1455
gagctcatct tgcaggctgg aagcaccagg gaattaattc cccagtcaa ccaatggcat 1515
ccagagaggg catggaggct ccatacaacc tcttccaccc ccacatcttt ctttgccta 1575
tacatgtctt ccatttggct gtttctgagt tgiagccttt ataataaagt ggtaaatgtt 1635
gtaactgc 1643

<210> 10

<211> 2186

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (118).. (1236)

<400> 10

actctttctt cggctcgcga gctgagagga gcaggtagag gggcagaggc gggactgtcg 60

tctgggggag cgcgccagga ggctcctcag gccgaccca gaccctggct ggccagg 117

atg aag tat ctc cgg cac cgg cgg ccc aat gcc acc ctc att ctg gcc 165

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala

1

5

10

15

atc ggc gct ttc acc ctc ctc ctc ttc agt ctg cta gtg tca cca ccc 213

Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro

20

25

30

acc tgc aag gtc cag gag cag cca ccg gcg atc ccc gag gcc ctg gcc 261

Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala

35

40

45

tgg ccc act cca ccc acc cgc cca gcc ccg gcc ccg tgc cat gcc aac 309

Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn

50

55

60

acc tct atg gtc acc cac ccg gac ttc gcc acg cag ccg cag cac gtt 357

Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val

65

70

75

80

cag aac ttc ctc ctg tac aga cac tgc cgc cac ttt ccc ctg ctg cag 405

Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln

85

90

95

gac gtg ccc ccc tct aag tgc gcg cag ccg gtc ttc ctg ctg ctg gtg 453

Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val

100

105

110

atc aag tcc tcc cct agc aac tat gtg cgc cgc gag ctg ctg cgg cgc 501
 Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg
 115 120 125

acg tgg ggc cgc gag cgc aag gta cgg ggt ttg cag ctg cgc ctc ctc 549
 Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu
 130 135 140

ttc ctg gtg ggc aca gcc tcc aac ccg cac gag gcc cgc aag gtc aac 597
 Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn
 145 150 155 160

cgg ctg ctg gag ctg gag gca cag act cac gga gac atc ctg cag tgg 645
 Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp
 165 170 175

gac ttc cac gac tcc ttc ttc aac ctc acg ctc aag cag gtc ctg ttc 693
 Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe
 180 185 190

tta cag tgg cag gag aca agg tgc gcc aac gcc agc ttc gtg ctc aac 741
 Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn
 195 200 205

ggg gat gat gac gtc ttt gca cac aca gac aac atg gtc ttc tac ctg 789
 Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu
 210 215 220

cag gac cat gac cct ggc cgc cac ctc ttc gtg ggg caa ctg atc caa 837

Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln

225 230 235 240

aac gtg ggc ccc atc cgg gct ttt tgg agc aag tac tat gtg cca gag 885

Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu

245 250 255

gtg gtg act cag aat gag cgg tac cca ccc tat tgt ggg ggt ggt ggc 933

Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly

260 265 270

ttc ttg ctg tcc cgc ttc acg gcc gct gcc ctg cgc cgt gct gcc cat 981

Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His

275 280 285

gtc ttg gac atc ttc ccc att gat gat gtc ttc ctg ggt atg tgt ctg 1029

Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu

290 295 300

gag ctt gag gga ctg aag cct gcc tcc cac agc ggc atc cgc acg tct 1077

Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser

305 310 315 320

ggc gtg cgg gct cca tcg caa cac ctg tcc tcc ttt gac ccc tgc ttc 1125

Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln His Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe

325 330 335

tac cga gac ctg ctg ctg gtg cac cgc ttc cta cct tat gag atg ctg 1173

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu

340

345

350

ctc atg tgg gat gcg ctg aac cag ccc aac ctc acc tgc ggc aat cag 1221

Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln

355

360

365

aca cag atc tac tga gtcagcatca gggccccag cctctgggct cctgtttcca 1276

Thr Gln Ile Tyr

370

taggaagggg cgacaccttc ctcccaggaa gctgagacct ttgtggctctg agcataaggg 1336

agtgccaggg aaggtttgag gtttgatgag tgaatattct ggctggcgaa ctctacaca 1396

tccttcaaaa cccacctggt actgttccag catcttcctt ggatggctgg aggaactcca 1456

gaaaatatcc atcttctttt tgtggctgct aatggcagaa gtgcctgtgc tagagtcca 1516

actgtggatg catccgtccc gtttgagtca aagtcttact tccctgctct cacctactca 1576

cagacgggat gctaagcagt gcacctgcag tggtttaatg gcagataagc tccgtctgca 1636

gttccaggcc agccagaaac tcctgtgtcc acatagagct gacgtgagaa atatctttca 1696

gcccaggaga gaggggtcct gatcttaacc ctttcctggg tctcagacaa ctcagaaggt 1756

tggggggata ccagagaggt ggtggaatag gaccgcccc tccttacttg tgggatcaaa 1816

tgctgtaatg gteggaggtgt gggcagagga gggaggcaag tgtcctttga aagtgtgag 1876

agctcagagt ttctggggtc ctcattagga gccccatcc ctgtgttccc caagaattca 1936

gagaacagca ctggggctgg aatgatcttt aatgggcccaggccaacag gcataatgcct 1996

cactactgcc tggagaaggg agagattcag gtcctccagc agcctccctc acccagtatg 2056

ttttacagat tacgggggga ccgggtgagc cagtgacccc ctgcagcccc cagcttcagg 2116

cctcagtgtc tgccagtcaa gcttcacagg catgtgatg gggcagcctt ggggaatata 2176

aaattttgtg 2186

<210> 11

<211> 814

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (145).. (693)

<400> 11

agaatcccgg acagccctgc' tccctgcagc cagggtgtagt ttcgggagcc actggggcca 60

aagtgagagt ccagcggctc tccagcgctt gggccacggc ggcgccctg ggagcagagg 120

tggagcgacc ccattacgct aaag atg aaa ggc tgg ggt tgg ctg gcc ctg 171

Met Lys Gly Trp Gly Trp Leu Ala Leu

1

5

ctt ctg ggg gcc ctg ctg gga acc gcc tgg gct cgg agg agc cag gat 219

Leu Leu Gly Ala Leu Leu Gly Thr Ala Trp Ala Arg Arg Ser Gln Asp

10

15

20

25

ctc cac tgt gga gca tgc agg gct ctg gtg gat gaa cta gaa tgg gaa 267

Leu His Cys Gly Ala Cys Arg Ala Leu Val Asp Glu Leu Glu Trp Glu

30

35

40

att gcc cag gtg gac ccc aag aag acc att cag atg gga tct ttc cgg 315

Ile Ala Gln Val Asp Pro Lys Lys Thr Ile Gln Met Gly Ser Phe Arg

45

50

55

atc aat cca gat ggc agc cag tca gtg gtg gag gtg cct tat gcc cgc 363

Ile Asn Pro Asp Gly Ser Gln Ser Val Val Glu Val Pro Tyr Ala Arg

60

65

70

tca gag gcc cac ctc aca gag ctg ctg gag gag ata tgt gac cgg atg 411

Ser Glu Ala His Leu Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Cys Asp Arg Met

75

80

85

aag gag tat ggg gaa cag att gat cct tcc acc cat cgc aag aac tac 459

Lys Glu Tyr Gly Glu Gln Ile Asp Pro Ser Thr His Arg Lys Asn Tyr

90

95

100

105

gta cgt gta gtg ggc cgg aat gga gaa tcc agt gaa ctg gac cta caa 507

Val Arg Val Val Gly Arg Asn Gly Glu Ser Ser Glu Leu Asp Leu Gln

110

115

120

ggc atc cga atc gac tca gat att agc ggc acc ctc aag ttt gcg tgt 555

Gly Ile Arg Ile Asp Ser Asp Ile Ser Gly Thr Leu Lys Phe Ala Cys

125

130

135

gag agc att gtg gag gaa tac gag gat gaa ctc att gaa ttc ttt tcc 603

Glu Ser Ile Val Glu Glu Tyr Glu Asp Glu Leu Ile Glu Phe Phe Ser

140

145

150

cga gag gct gac aat gtt aaa gac aaa ctt tgc agt aag cga aca gat 651

Arg Glu Ala Asp Asn Val Lys Asp Lys Leu Cys Ser Lys Arg Thr Asp

155

160

165

ctt tgt gac cat gcc ctg cac ata tcg cat gat gag cta tga 693

Leu Cys Asp His Ala Leu His Ile Ser His Asp Glu Leu

170

175

180

accactggag cagccacac tggcttgatg gatcaccccc aggaggggaa aatgggtggca 753

atgcctttta tatattatgt ttttactgaa attaactgaa aaaatatgaa accaaaagta 813



c

814

<210> 12

<211> 695

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (73).. (564)

<400> 12

aagatttcag ctgcgggacg gtcaggggag acctccaggc gcaggggaagg acggccaggg 60

tgacacggaa gc atg cga cgg ctg ctg atc cct ctg gcc ctg tgg ctg ggc 111

Met Arg Arg Leu Leu Ile Pro Leu Ala Leu Trp Leu Gly

1

5

10

gcg gtg ggc gtg ggc gtc gcc gag ctc acg gaa gcc cag cgc cgg ggc 159

Ala Val Gly Val Gly Val Ala Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly

15

20

25

ctg cag gtg gcc ctg gag gaa ttt cac aag cac ccg ccc gtg cag tgg 207

Leu Gln Val Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp

30

35

40

45

gcc ttc cag gag acc agt gtg gag agc gcc gtg gac acg ccc ttc cca 255



Ala Phe Gln Glu Thr Ser Val Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro

50

55

60

gct gga ata ttt gtg agg ctg gaa ttt aag ctg cag cag aca agc tgc 303

Ala Gly Ile Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys

65

70

75

cgg aag agg gac tgg aag aaa ccc gag tgc aaa gtc agg ccc aat ggg 351

Arg Lys Arg Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly

80

85

90

agg aaa cgg aaa tgc ctg gcc tgc atc aaa ctg ggc tct gag gac aaa 399

Arg Lys Arg Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys

95

100

105

gtt ctg ggc cgg ttg gtc cac tgc ccc ata gag acc caa gtt ctg cgg 447

Val Leu Gly Arg Leu Val His Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg

110

115

120

125

gag gct gag gag cac cag gag acc cag tgc ctc agg gtg cag cgg gct 495

Glu Ala Glu Glu His Gln Glu Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala

130

135

140

ggg gag gac ccc cac agc ttc tac ttc cct gga cag ttc gcc ttc tcc 543

Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser

145

150

155

aag gcc ctg ccc cgc agc taa gccagcactg agctgcgtgg tgcctccagg 594



Lys Ala Leu Pro Arg Ser

160

accgctgccg gtggtaacca gtggaagacc ccagcccca gggagaggac cccgttctat 654

ccccagccat gataataaag ctgctctccc agctgcctct c 695

<210> 13

<211> 1451

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (105).. (1436)

<400> 13

actgcctgga aacgggctgg gcctgcctcg gacgccgccg gtgtcgcgga ttctctttcc 60

gcccgcctcca tggcggigga tgctgactg gaagcccag tggg atg cgg ctg acg 116

Met Arg Leu Thr

1

cgg aag cgg ctc tgc tgc ttt ctt atc gcc ctg tac tgc cta ttc tcc 164

Arg Lys Arg Leu Cys Ser Phe Leu Ile Ala Leu Tyr Cys Leu Phe Ser

5

10

15

20



ctc tac gct gcc tac cac gtc ttc ttc ggg cgc cgc cgc cag gcg ccg 212

Leu Tyr Ala Ala Tyr His Val Phe Phe Gly Arg Arg Arg Gln Ala Pro

25

30

35

gcc ggg tcc ccg cgg ggc ctc agg aag ggg gcg gcc ccc gcg cgg gag 260

Ala Gly Ser Pro Arg Gly Leu Arg Lys Gly Ala Ala Pro Ala Arg Glu

40

45

50

aga cgc ggc cga gaa cag tcc act ttg gaa agt gaa gaa tgg aat cct 308

Arg Arg Gly Arg Glu Gln Ser Thr Leu Glu Ser Glu Glu Trp Asn Pro

55

60

65

tgg gaa gga gat gaa aaa aat gag caa caa cac aga ttt aaa act agc 356

Trp Glu Gly Asp Glu Lys Asn Glu Gln Gln His Arg Phe Lys Thr Ser

70

75

80

ctt caa ata tta gat aaa tcc acg aaa gga aaa aca gat ctc agt gta 404

Leu Gln Ile Leu Asp Lys Ser Thr Lys Gly Lys Thr Asp Leu Ser Val

85

90

95

100

caa atc tgg ggc aaa gct gcc att ggc ttg tat ctc tgg gag cat att 452

Gln Ile Trp Gly Lys Ala Ala Ile Gly Leu Tyr Leu Trp Glu His Ile

105

110

115

ttt gaa ggc tta ctt gat ccc agc gat gtg act gct caa tgg aga gaa 500

Phe Glu Gly Leu Leu Asp Pro Ser Asp Val Thr Ala Gln Trp Arg Glu

120

125

130

gga aag tca atc gta gga aga aca cag tac agc ttc atc act ggt cca 548

Gly Lys Ser Ile Val Gly Arg Thr Gln Tyr Ser Phe Ile Thr Gly Pro

135

140

145

gct gta ata cca ggg tac ttc tcc gtt gat gtg aat aat gtg gta ctc 596

Ala Val Ile Pro Gly Tyr Phe Ser Val Asp Val Asn Asn Val Val Leu

150

155

160

att tta aat gga aga gaa aaa gca aag atc ttt tat gcc acc cag tgg 644

Ile Leu Asn Gly Arg Glu Lys Ala Lys Ile Phe Tyr Ala Thr Gln Trp

165

170

175

180

tta ctt tat gca caa aat tta gtg caa att caa aaa ctc cag cat ctt 692

Leu Leu Tyr Ala Gln Asn Leu Val Gln Ile Gln Lys Leu Gln His Leu

185

190

195

gct gtt gtt ttg ctc gga aat gaa cat tgt gat aat gag tgg ata aac 740

Ala Val Val Leu Leu Gly Asn Glu His Cys Asp Asn Glu Trp Ile Asn

200

205

210

cca ttc ctc aaa aga aat gga ggc ttc gtg gag ctg ctt ttc ata ata 788

Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Gly Phe Val Glu Leu Leu Phe Ile Ile

215

220

225

tat gac agc ccc tgg att aat gac gtg gat gtt ttt cag tgg cct tta 836

Tyr Asp Ser Pro Trp Ile Asn Asp Val Asp Val Phe Gln Trp Pro Leu

230

235

240

gga gta gca aca tac agg aat ttt cct gtg gtg gag gca agt tgg tca 884

Gly Val Ala Thr Tyr Arg Asn Phe Pro Val Val Glu Ala Ser Trp Ser

245 250 255 260

atg ctg cat gat gag agg cca tat tta tgt aat ttc tta gga acg att 932

Met Leu His Asp Glu Arg Pro Tyr Leu Cys Asn Phe Leu Gly Thr Ile

265 270 275

tat gaa aat tca tcc aga cag gca cta atg aac att ttg aaa aaa gat 980

Tyr Glu Asn Ser Ser Arg Gln Ala Leu Met Asn Ile Leu Lys Lys Asp

280 285 290

ggg aac gat aag ctt tgt tgg gtt tca gca aga gaa cac tgg cag cct 1028

Gly Asn Asp Lys Leu Cys Trp Val Ser Ala Arg Glu His Trp Gln Pro

295 300 305

cag gaa aca aat gaa agt ctt aag aat tac caa gat gcc ttg ctt cag 1076

Gln Glu Thr Asn Glu Ser Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Ala Leu Leu Gln

310 315 320

agt gat ctc aca ttg tgc ccg gtc gga gta aac aca gaa tgc tat cga 1124

Ser Asp Leu Thr Leu Cys Pro Val Gly Val Asn Thr Glu Cys Tyr Arg

325 330 335 340

atc tat gag gct tgc tcc tat ggc tcc att cct gtg gtg gaa gac gtg 1172

Ile Tyr Glu Ala Cys Ser Tyr Gly Ser Ile Pro Val Val Glu Asp Val

345 350 355



atg aca gct ggc aac tgt ggg aat aca tct gtg cac cac ggt gct cct 1220

Met Thr Ala Gly Asn Cys Gly Asn Thr Ser Val His His Gly Ala Pro

360

365

370

ctg cag tta ctc aag tcc atg ggt gct ccc ttt atc ttt atc aag aac 1268

Leu Gln Leu Leu Lys Ser Met Gly Ala Pro Phe Ile Phe Ile Lys Asn

375

380

385

tgg aag gaa ctc cct gct gtt tta gaa aaa gag aaa act ata att tta 1316

Trp Lys Glu Leu Pro Ala Val Leu Glu Lys Glu Lys Thr Ile Ile Leu

390

395

400

caa gaa aaa att gaa aga aga aaa atg tta ctt cag tgg tat cag cac 1364

Gln Glu Lys Ile Glu Arg Arg Lys Met Leu Leu Gln Trp Tyr Gln His

405

410

415

420

ttc aag aca gag ctt aaa atg aaa ttt act aat att tta gaa agc tca 1412

Phe Lys Thr Glu Leu Lys Met Lys Phe Thr Asn Ile Leu Glu Ser Ser

425

430

435

ttt tta atg aat aat aaa agt taa ttatcttttt gagct 1451

Phe Leu Met Asn Asn Lys Ser

440

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, C07K16/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/00-15/90		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATO S. et al., "Selection of cDNAs encoding putative type II membrane proteins on the cell surface from a human full-length cDNA bank", Gene, 04 March, 1999, 228(1-2), pages 161 to 167	3, 4 1, 2
A	LEWIS P. J. et al., "Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response", J. Virol., December, 1999, 73(12), pages 10214 to 10223	1-4
A	BOYLE J. S. et al., "Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization", Int. Immunol., December, 1997, 9(12), pages 1897 to 1906	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 October, 2001 (16.10.01)		Date of mailing of the international search report 13 November, 2001 (13.11.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06371

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WAINE G. J. et al., "DNA immunization by intramuscular injection or gene gun induces specific IgG antibodies against a Schistosoma japonicum 22 kDa antigen, Sj22, when fused to the murine Ig K-chain secretory leader sequence", Parasite Immunol., January, 1999, 21(1), pages 53 to 56	1-4
A	CHEN Y. et al., "DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors", Cancer Res., 01 May, 1998, 58(9), pages 1965 to 1971	1-4
A	Lewis P. J. et al., "Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle", J. Gen. Virol., April, 1998, 79 (part 4), pages 831 to 839	1-4
A	XIANG Z. Q. et al., "Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus", Virology, 01 June, 1995, 209(2), pages 569 to 579	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN2000:68682 TORRES C. A. et al., "DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses", Vaccine, 10 December, 1999, 18(9-10), pages 805 to 814	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN1999:195880 FOMSGAARD A. et al., "HIV-1 DNA vaccines", Immunol. Lett., January, 1999, 65(1-2), pages 127 to 131	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN2000:280160 DREWD. R. et al., "Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen", Vaccine, 22 May, 2000, 18(23), pages 2522 to 2532	1-4
P,A	Database BIOSIS on STN, AN2001:122889 CHENG W. F. et al., "Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments", Hum. Gene. Ther., 10 February, 2001, 12(3), pages 235 to 252	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KATO S. et al., Selection of cDNAs encoding putative type II membrane proteins on the cell surface from a human full-length cDNA bank. Gene, 1999 Mar 4, 228 (1-2), p. 161-7.	3, 4 1, 2
A	LEWIS P. J. et al., Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. J Virol, 1999 Dec, 73 (12), p. 10214-23.	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.01

国際調査報告の発送日

13.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BOYLE J.S. et al., Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. Int Immunol, 1997 Dec, 9(12), p. 1897-906	1-4
A	WAINE G.J. et al., DNA immunization by intramuscular injection or gene gun induces specific IgG antibodies against a Schistosoma japonicum 22 kDa antigen, Sj22, when fused to the murine Ig K-chain secretory leader sequence. Parasite Immunol, 1999 Jan, 21(1), p. 53-6	1-4
A	CHEN Y. et al., DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors. Cancer Res, 1998 May 1, 58(9), p. 1965-71	1-4
A	Lewis P.J. et al., Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. J Gen Virol, 1998 Apr, 79 (Pt 4), p. 831-9	1-4
A	XIANG Z.Q. et al., Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. Virology, 1995 Jun 1, 209(2), p. 569-79	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN2000:68682 TORRES C.A. et al., DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses. Vaccine, 1999 Dec 10, 18(9-10), p. 805-14	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN1999:195880 FOMSGAARD A. et al., HIV-1 DNA vaccines. Immunol Lett, 1999 Jan, 65(1-2), p. 127-31	1-4
A	Database BIOSIS on STN, AN2000:280160 DREW D.R. et al., Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen. Vaccine, 2000 May 22, 18(23), p. 2522-32	1-4
PA	Database BIOSIS on STN, AN2001:122889 CHENG W.F. et al., Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. Hum Gene Ther, 2001 Feb 10, 12(3), p. 235-52	1-4